



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1635  
Examiner : James Schultz  
Serial No. : 10/735,512  
Filed : December 12, 2003  
Inventor : Salman Al-Mahmood  
Title : ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES  
: CAPABLE OF INHIBITING THE  
: FORMATION OF CAPILLARY  
: TUBES BY ENDOTHELIAL CELLS

Customer No.: 035811

Docket No.: 1414-03

Confirmation No. 6845

Dated: April 25, 2007

---

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

We submit herewith the certified copy of French Patent Application No. 0107805, filed June 14, 2001, the priority of which is hereby claimed.

Respectfully submitted,

T. Daniel Christenbury  
Reg. No. 31,750  
Attorney for Applicant

TDC/cc  
(215) 656-3381



*Tju*

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1635  
Examiner : James Schultz  
Serial No. : 10/735,512  
Filed : December 12, 2003  
Inventor : Salman Al-Mahmood  
Title : ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES  
: CAPABLE OF INHIBITING THE  
: FORMATION OF CAPILLARY  
: TUBES BY ENDOTHELIAL CELLS

Customer No.: 035811

Docket No.: 1414-03

Confirmation No. 6845

Dated: April 25, 2007

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

**Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8**

For

Postcard  
Claim for Priority  
French Appl. No. 0107805

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class Mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date appearing below.

Name of Applicant, Assignee, Applicant's Attorney  
or Registered Representative:

DLA Piper US LLP  
Customer No. 35811

By: *Carol Coney*  
Date: *April 25, 2007*



01 0 7805  
Blasland  
①

# Brevet d'invention

Certificat d'utilité

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 AVR. 2007

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M+Planche", is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

**Important**

Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

REMISE DES PIÈCES DATE <b>14 JUIN 2001</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0107805</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>14 JUIN 2001</b> PAR L'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  BREESE-MAJEROWICZ 3 avenue de l'Opéra 75001 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 6531FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date ____/____/____			
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____			
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS CAPABLES D'INHIBER LA FORMATION DES TUBES CAPILLAIRES PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		AL-MAHMOOD	
Prénoms		Salman	
Forme juridique			
N° SIREN		. . . . .	
Code APE-NAF		. . . . .	
Adresse	Rue	2 square Alice	
	Code postal et ville	75014	PARIS
Pays		France	
Nationalité		France	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE <b>14 JUIN 2001</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0107805</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		6531FR	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		BREESE	
Prénom		Pierre	
Cabinet ou Société		BREESE-MAJEROWICZ	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 avenue de l'Opéra	
	Code postal et ville	75001	Paris
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 77	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 78	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		office@breese.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  BREESE Pierre 921038		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  M. BLANCANEUX	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

# OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS CAPABLES D'INHIBER LA FORMATION DES TUBES CAPILLAIRES PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES.

La présente invention a pour objet des  
5 oligonucléotides antisens capables d'inhiber l'expression  
de la protéine IRS-1 et d'inhiber la formation des tubes  
capillaires par les cellules endothéliales. Les  
oligonucléotides selon l'invention sont donc indiquées  
comme agent anti-angiogéniques. Ils sont également  
10 indiqués comme agents anti-multiplication cellulaire, en  
particulier comme agents anti-tumoraux.

L'invention concerne aussi des compositions  
pharmaceutiques contenant lesdits oligonucléotides et  
l'utilisation desdits oligonucléotides comme réactifs  
15 d'analyse.

L'angiogénèse est un processus fondamental  
par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment. Ce  
processus est essentiel dans plusieurs phénomènes  
physiologiques normaux tels que la reproduction, le  
20 développement ou encore la cicatrisation. Dans ces  
phénomènes biologiques normaux, l'angiogénèse est sous  
contrôle strict, c'est-à-dire qu'elle est déclenchée  
pendant une période courte (quelques jours), puis  
complètement inhibée. Cependant, plusieurs pathologies  
25 sont liées à une angiogénèse invasive et incontrôlée;  
l'arthrite, une pathologie due à l'endommagement des  
cartilages par les néovaisseaux invasifs; la rétinopathie  
diabétique où l'invasion de la rétine par les  
néovaisseaux conduit à l'aveuglement des malades; la  
30 néovascularisation de l'appareil oculaire présente la  
cause majeure de l'aveuglement, et cette  
néovascularisation intervient dans une vingtaine de  
maladies de l'œil; ou encore la croissance et la

métastase des tumeurs qui sont liées directement à la néovascularisation et sont dépendantes de l'angiogénèse. La tumeur stimule la croissance des néovaisseaux pour sa croissance elle-même. De plus, ces néovaisseaux sont des  
5 voies d'échappement des tumeurs qui joignent ainsi la circulation sanguine et provoquent des métastases dans des sites éloignés du foyer tumoral initial, comme le foie, le poumon ou l'os.

10 La formation de néovaisseaux par les cellules endothéliales, l'angiogénèse, implique la migration, la croissance, et la différenciation des cellules endothéliales. La régulation de ces phénomènes biologiques est directement liée à l'expression génétique.

15 Ainsi, les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont permis d'identifier et de préparer des séquences d'acide nucléique impliquées dans la régulation de l'angiogénèse.

20 D'autres travaux concernant l'angiogénèse ont permis de mettre en évidence une expression importante et une phosphorylation, au niveau d'un résidu tyrosine d'une protéine intracellulaire de 180 kDa, par les cellules endothéliales cultivées sur un tapis du collagène type I et stimulées par un facteur angiogénique tel que le bFGF.  
25 L'expression importante et la phosphorylation au niveau du résidu tyrosine de la protéine intracellulaire de 180 kDa accompagnent la formation des tubes capillaires par les cellules endothéliales.

30 Cette protéine est déjà connue en tant que substrat du récepteur de l'insuline (nommé IRS-1). Elle a été, en effet, partiellement identifiée et étudiée par certains auteurs travaillant sur le diabète (Quon et al., J. Biol. Chem. (1994), 269 (45), 27920-27924).

Ces auteurs ont étudié le rôle de l'IRS-1 sur  
(i) la translocation du GLUT 4 stimulée par l'insuline et  
(ii) le transport du glucose, dans des cellules adipeuses  
de rat. Pour ce faire, ils ont construit un plasmide  
contenant :

- un oligonucléotide bicaténaire, obtenu à  
partir de l'oligonucléotide sens de séquence SEQ ID No. 1  
suivante : 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC  
TGGCCTAG-3', et

- l'ADNc codant pour l'IRS-1 humain,  
et ont transfecté des cellules adipeuses de  
rat avec ledit plasmide.

Les travaux menés dans le cadre de la  
présente invention ont mis en évidence le fait que  
l'expression de la protéine IRS-1 est également induite  
dans les cellules endothéliales lorsque ces dernières  
sont stimulées par le facteur angiogénique bFGF.

Dans le cadre de l'invention, des  
oligonucléotides anti-sens du gène codant pour cette  
protéine ont été préparés. Ces oligonucléotides  
présentent des activités anti-angiogénique et anti-  
tumorale remarquables. Ils sont donc particulièrement  
utiles pour le traitement des maladies liées à une  
angiogénèse invasive et non contrôlée par des méthodes de  
thérapies géniques consistant à administrer à un individu  
une composition contenant au moins un de ces  
oligonucléotides.

Ainsi, un oligonucléotide selon l'invention  
est constitué par la séquence nucléotidique de formule  
SEQ ID No.2 suivante :



5'-TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3',

un fragment de celle-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

L'invention concerne tout particulièrement un oligonucléotide constitué par l'une des séquences nucléotidiques de formules SEQ ID No.3 et 4 suivantes :

5'-TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCT-3' ,

5'-TCGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3' ,

un fragment de celles-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

On entend par dérivé, une séquence capable de s'hybrider dans des conditions strictes avec l'une des séquences SEQ ID No.2, 3 ou 4 ou avec un fragment de celles-ci d'au moins 12 nucléotides contigus.

A titre d'exemples d'oligonucléotides selon l'invention, on peut mentionner ceux de séquences suivantes :

SEQ ID No.5: 5'-TATCCGGAGGGCCTGCCATGCTGCT-3'

SEQ ID No.6: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG CTGC-3'

SEQ ID No.7: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG CTG-3'

SEQ ID No.8: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG CT-3'

SEQ ID No.9: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG C-3'

SEQ ID No.10: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG-3'

SEQ ID No.11: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCAT-3'

SEQ ID No.12: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCA-3'

SEQ ID No.13: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCC-3'

SEQ ID No.14: 5'-TATCCGGAGG GCCTGC-3'

SEQ ID No.15: 5'-TATCCGGAGG GCCTG-3'

SEQ ID No.16: 5'-TATCCGGAGG GCCT-3'

SEQ ID No.17: 5'-TATCCGGAGG GCC-3'

SEQ ID No.18: 5'-TATCCGGAGG GC-3'

SEQ ID No.19: 5'-CCGGAGG GCCTGCCATG CTGCT-3'

SEQ ID No.20: 5'-GAGG GCCTGCCATG CTGCT-3'

SEQ ID No.21: 5'-G GCCTGCCATG CTGCT-3'

SEQ ID No.22: 5'-CTGCCATG CTGCT-3'

SEQ ID No.23: 5'-TGCCATG CTGCT-3'

5           Avantageusement, tout ou partie des liaisons  
phosphodiester des oligonucléotides de l'invention sont  
protégées. Cette protection s'effectue généralement par  
voie chimique, selon des méthodes classiques bien connues  
de l'homme du métier. Par exemple, on peut protéger les  
liaisons phosphodiester par une fonction thiol ou amine  
10       ou bien encore par un groupement phényle.

          De façon également avantageuse, les  
extrémités 5'- et/ou 3'- des oligonucléotides de  
l'invention sont protégées, par exemple en utilisant la  
technique indiquée précédemment pour protéger les  
15       liaisons phosphodiester.

          Les oligonucléotides de l'invention peuvent  
être synthétisés selon les techniques conventionnelles  
bien connues de l'homme du métier, par exemple à l'aide  
d'un synthétiseur d'ADN commercialisé par différents  
20       sociétés.

          Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas  
entièrement élucidé, les oligonucléotides selon  
l'invention inhibent l'expression de la protéine IRS-1 au  
25       sein des cellules endothéliales. Ces oligonucléotides  
sont capables de bloquer la formation des néovaisseaux  
par les cellules endothéliales (i.e. inhibent  
l'angiogénèse), et de ce fait ils inhibent la  
multiplication des cellules tumorales chez la souris.

30       L'invention a donc aussi pour objet une  
composition pharmaceutique pour l'inhibition du gène  
codant pour la protéine IRS-1 comprenant un

oligonucléotide complémentaire d'une partie dudit gène ou d'un transcrit dudit gène.

Une telle composition comprend avantageusement comme agent actif au moins un oligonucléotide défini précédemment, avantageusement associé dans ladite composition avec un véhicule acceptable.

L'analyse des travaux réalisés dans le cadre de l'invention a donc permis de montrer que la protéine IRS-1 représente un constituant cellulaire essentiel dans le processus de l'angiogénèse. En effet, l'inhibition de l'expression de la protéine IRS-1 par lesdits oligonucléotides antisens conduit à l'inhibition de la formation de tubes capillaires par les cellules endothéliales.

Les oligonucléotides selon l'invention et les compositions les contenant sont donc indiquées comme agent anti-angiogénique. Ils sont également indiqués comme agents anti-multiplication cellulaire, en particulier comme agents anti-tumoraux, et en conséquence sont tout particulièrement utiles pour le traitement des tumeurs. L'invention a donc pour objet l'utilisation desdits oligonucléotides pour la préparation d'une composition destinée au traitement ou à la prévention de pathologies liées à une angiogénèse invasive et incontrôlée, comme par exemple à titre non limitatif: l'arthrite, la rétinopathie diabétique, des maladies de l'œil liées à la néovascularisation de l'appareil oculaire, la croissance et la métastase des tumeurs.

Les compositions pharmaceutiques ci-dessus sont plus particulièrement réalisées de manière à pouvoir être administrées par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou transdermique. Pour une telle

administration, on utilise notamment des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles, par exemple le propylèneglycol ou le butylèneglycol.

La dose unitaire usuelle à administrer contient de 0,001 mg à 50 mg de principe actif.

Les oligonucléotides de l'invention sont aussi utiles comme réactif de recherche, notamment pour l'étude *in vitro* des voies de signalisation impliquant la protéine 180 kDa, par exemple sur des cellules, tumorales ou non, transfectées par lesdits oligonucléotides. Ils sont également utiles pour l'étude *in vivo* des voies de signalisation impliquant la protéine 180 kDa dans un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques, comme l'angiogénèse ou la cancérogenèse, essentiellement à partir du rapport kinase/phosphatase.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent dans lesquels on désigne par "oligonucléotide" l'oligonucléotide de séquence ID NO.1 et qui font référence aux figures jointes annexe dans lesquelles :

- la figure 1A représente l'image du Western Blot obtenu à partir des échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste S), révélée par un anticorps anti-IRS-1.

- la figure 1B montre l'image du Western blot obtenue après coloration au nitrate d'argent à partir des

administration, on utilise notamment des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles, par exemple le propylèneglycol ou le butylèneglycol.

La dose unitaire usuelle à administrer contient de 0,001 mg à 50 mg de principe actif.

L'invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un des oligonucléotides de l'invention, destinées à être utilisées dans le traitement d'une rétinopathie.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un des oligonucléotides de l'invention, destinées à être utilisées dans la prévention de mélanomes.

Les oligonucléotides de l'invention sont aussi utiles comme réactif de recherche, notamment pour l'étude *in vitro* des voies de signalisation impliquant la protéine 180 kDa, par exemple sur des cellules, tumorales ou non, transfectées par lesdits oligonucléotides. Ils sont également utiles pour l'étude *in vivo* des voies de signalisation impliquant la protéine 180 kDa dans un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques, comme l'angiogénèse ou la cancérogenèse, essentiellement à partir du rapport kinase/phosphatase.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent dans lesquels on désigne par "oligonucléotide"

mêmes échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste S)

5                   - la figure 2 montre les images du Western Blot obtenues à partir des échantillons des surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste B), lorsque la membrane est incubée avec un anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine et révélée avec un anticorps anti-isotype  
10                   marqué à la peroxydase comme indiqué dans l'exemple 3,

                  - Les figure 3A à 3D montrent les images des cultures, sur un tapis du collagène type I, des  
15                   différents lots de cellules épithéliales :

                  - La figure 3A montre la culture des cellules endothéliales non traitées.

                  - La figure 3B montre la culture des cellules endothéliales stimulées avec 3 ng/ml de bFGF.

20                   - la figure 3C montre la culture des cellules endothéliales incubés avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures, puis stimulées avec 3 ng/ml de bFGF.

                  - la figure 3D montre la culture des cellules  
25                   endothéliales incubés avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures.

30                   Exemple 1 : Mise en évidence de l'induction de l'expression d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa) dans les cellules endothéliales suite à la stimulation de ces cellules par le bFGF.

l'oligonucléotide de séquence ID NO.1 et qui font référence aux figures jointes annexe dans lesquelles :

5 - la figure 1A représente l'image du Western Blot obtenu à partir des échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste S), révélée par un anticorps anti-IRS-1.

10 - la figure 1B montre l'image du Western blot obtenue après coloration au nitrate d'argent à partir des mêmes échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste S)

15 - la figure 2 montre les images du Western Blot obtenues à partir des échantillons des surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste B), lorsque la membrane est incubée avec un anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine et révélée avec un anticorps anti-isotype  
20 marqué à la peroxydase comme indiqué dans l'exemple 3,

- Les figure 3A à 3D montrent les images des cultures, sur un tapis du collagène type I, des  
25 différents lots de cellules épithéliales :

- La figure 3A montre la culture des cellules endothéliales non traitées.

- La figure 3B montre la culture des cellules endothéliales stimulées avec 3 ng/ml de bFGF.

30 - la figure 3C montre la culture des cellules endothéliales incubés avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures, puis stimulées avec 3 ng/ml de bFGF.

La protéine 180 kDa a été mise en évidence de la manière suivante :

Les cellules endothéliales ont été mises en culture dans une plaque de microtitration à 6 puits préalablement recouverts avec du collagène type I comme décrit dans (Montesano et al., J. Cell. Biol., 1983, 83, 1648-1652). Le milieu de culture est le DMEM (Sigma) enrichi avec 10 % de sérum de vœu fœtal, 4 mM glutamine, 500 U/ml pénicilline, et 100 µg/ml streptomycine. Après 3 à 4 jours de culture, on obtient une couche semi-confluente des cellules endothéliales. Les milieux de culture de six puits ont été aspirés et remplacés par du milieu de culture frais. Trois puits ont été enrichis avec 3 ng/ml de bFGF. Après une incubation de 48 heures, les différents puits sont lavés trois fois avec un tampon phosphate, et les cellules sont utilisées pour extraire l'ARN messager (ARNm) selon des protocoles connus de l'homme du métier. Les ARNm sont reverse transcrits par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant chacun des quatre groupes dégénérés d'amorces oligo(dT) (T12MN), M peut être G, A, ou C; et N est G, A, T, et C. Chaque groupe d'amorces est dicté par la base en position 3'(N), avec une dégénérescence dans la position (M). Exemple: le set d'amorces où N = G est constitué de:

SEQ ID No.24: 5'-TTTTTTTTTTTGG-3'

SEQ ID No.25: 5'-TTTTTTTTTTTAG-3'

SEQ ID No.26: 5'-TTTTTTTTTTTCG-3'

Les ADNc ainsi obtenus sont amplifiés et marqués au moyen d'un décamère arbitraire, en présence d'ATP marqué isotopiquement. L'analyse des ADNc amplifiés par électrophorèse a révélé la présence d'un fragment d'ADNc de 326 bp amplifié dans l'échantillon issu des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF, identifié



- la figure 3D montre la culture des cellules endothéliales incubés avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures.

5

Exemple 1 : Mise en évidence de l'induction de l'expression d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa) dans les cellules endothéliales suite à la stimulation de ces cellules par le bFGF.

10

La protéine 180 kDa a été mise en évidence de la manière suivante :

Les cellules endothéliales ont été mises en culture dans une plaque de microtitration à 6 puits préalablement recouverts avec du collagène type I comme décrit dans (Montesano et al., J. Cell. Biol., 1983, 83, 1648-1652). Le milieu de culture est le DMEM (Sigma) enrichi avec 10 % de sérum de vœu fœtal, 4 mM glutamine, 500 U/ml pénicilline, et 100 µg/ml streptomycine. Après 3 à 4 jours de culture, on obtient une couche semi-confluente des cellules endothéliales. Les milieux de culture de six puits ont été aspirés et remplacés par du milieu de culture frais. Trois puits ont été enrichis avec 3 ng/ml de bFGF. Après une incubation de 48 heures, les différents puits sont lavés trois fois avec un tampon phosphate, et les cellules sont utilisées pour extraire l'ARN messager (ARNm) selon des protocoles connus de l'homme du métier. Les ARNm sont reverse transcrits par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant chacun des quatre groupes dégénérés d'amorces oligo(dT) (T12MN), M peut être G, A, ou C; et N est G, A, T, et C. Chaque groupe d'amorces est dicté par la base en

15

20

25

30

dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID.No. : 27, cependant, ce même fragment est faiblement présent ou présent à l'état de trace dans l'échantillon issu des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF. Le séquençage de ce fragment et l'interrogation subséquente des banques des données ont révélé que ce fragment correspond à une partie d'un gène déjà connu, codant pour le substrat du récepteur de l'insuline (une protéine intracellulaire de 180 kDa).

Exemple 2 : Mise en évidence de l'induction de l'expression d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa).

Des cellules endothéliales en culture sur un tapis du collagène type I stimulées ou non stimulées avec le bFGF (cf. exemple 1) sont lysées dans un tampon de lyse cellulaire contenant de l'orthovanadate de sodium. Ces solutions sont en suite clarifiées par centrifugation à 14000 g pendant 15 min. Des échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées et des cellules stimulées avec le bFGF, contenant des quantités équivalentes de protéines ont été repris avec une solution d'électrophorèse contenant 2% SDS et 15 mM de dithiothréitol, chauffés à 100 °C pendant 5 min. puis déposés en gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 15% en acrylamide) dans des conditions dénaturantes (en présence de 2% SDS). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée par une incubation à température ambiante dans une solution de 5% de lait dans un tampon PBS. La membrane est ensuite lavée trois fois avec un tampon PBS, incubée dans un tampon PBS contenant 1 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-IRS-1 pendant 2 heures à température ambiante, et lavée trois fois avec un tampon

position 3' (N), avec une dégénérescence dans la position (M). Exemple: le set d'amorces où N = G est constitué de:

SEQ ID No.24: 5'-TTTTTTTTTTTGG-3'

SEQ ID No.25: 5'-TTTTTTTTTTTAG-3'

5 SEQ ID No.26: 5'-TTTTTTTTTTTCG-3'

Les ADNc ainsi obtenus sont amplifiés et marqués au moyen d'un décamère arbitraire, en présence d'ATP marqué isotopiquement. L'analyse des ADNc amplifiés par électrophorèse a révélé la présence d'un fragment  
10 d'ADNc de 326 bp amplifié dans l'échantillon issu des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF, identifié dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID.No. : 27, cependant, ce même fragment est faiblement présent ou présent à l'état de trace dans l'échantillon  
15 issu des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF. Le séquençage de ce fragment et l'interrogation subséquente des banques des données ont révélé que ce fragment correspond à une partie d'un gène déjà connu, codant pour le substrat du récepteur de l'insuline (une  
20 protéine intracellulaire de 180 kDa).

Exemple 2 : Mise en évidence de l'induction de l'expression d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa).

Des cellules endothéliales en culture sur un  
25 tapis du collagène type I stimulées ou non stimulées avec le bFGF (cf. exemple 1) sont lysées dans un tampon de lyse cellulaire contenant de l'orthovanadate de sodium. Ces solutions sont en suite clarifiées par centrifugation à 14000 g pendant 15 min. Des échantillons de surnageants  
30 issus des cellules non stimulées et des cellules stimulées avec le bFGF, contenant des quantités équivalentes de protéines ont été repris avec une solution d'électrophorèse contenant 2% SDS et 15 mM de

PBS. Les protéines sont ensuite révélées au moyen d'un anticorps secondaire anti-isotype couplé à la peroxydase. On constate la présence d'une protéine de poids moléculaire 180 kDa reconnue par l'anticorps anti-IRS-1 monoclonal dans les préparations issues des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF; cette protéine est faiblement présente dans la préparation issue des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF (Figure 1).

Exemple 3 : Mise en évidence de l'induction de la phosphorylation au niveau de tyrosine d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa) .

Des cellules endothéliale humaines en culture sur un tapis du collagène type I stimulées ou non stimulées avec le bFGF sont lysées dans un tampon de lyse cellulaire contenant de l'orthovanadate de sodium. Ces solutions sont ensuite clarifiées par centrifugation à 14000 g pendant 15 min (cf. exemple 2). La protéine IRS-1 a été extraite grâce à un anticorps monoclonal anti-IRS-1. Cette extraction est réalisée après une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-IRS-1 (Sigma). Après addition de l'anticorps anti-IRS-1 couplé à l'agarose, la suspension est incubée pendant 2 heures à température ambiante, puis centrifugée à 4000 g pendant 15 min. Le précipité obtenu est repris avec une solution d'électrophorèse contenant 2% SDS et 15 mM de dithiothréitol, chauffé à 100 °C pendant 5 min. puis déposé en gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 15% en acrylamide) dans des conditions dénaturantes (en présence de 2% SDS). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée par une incubation à température

dithiothréitol, chauffés à 100 °C pendant 5 min. puis déposés en gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 15% en acrylamide) dans des conditions dénaturantes (en présence de 2% SDS). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée par une incubation à température ambiante dans une solution de 5% de lait dans un tampon PBS. La membrane est ensuite lavée trois fois avec un tampon PBS, incubée dans un tampon PBS contenant 1 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-IRS-1 pendant 2 heures à température ambiante, et lavée trois fois avec un tampon PBS. Les protéines sont ensuite révélées au moyen d'un anticorps secondaire anti-isotype couplé à la peroxydase. On constate la présence d'une protéine de poids moléculaire 180 kDa reconnue par l'anticorps anti-IRS-1 monoclonal dans les préparations issues des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF; cette protéine est faiblement présente dans la préparation issue des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF (Figure 1).

Exemple 3 : Mise en évidence de l'induction de la phosphorylation au niveau de tyrosine d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa) .

Des cellules endothéliale humaines en culture sur un tapis du collagène type I stimulées ou non stimulées avec le bFGF sont lysées dans un tampon de lyse cellulaire contenant de l'orthovanadate de sodium. Ces solutions sont ensuite clarifiées par centrifugation à 14000 g pendant 15 min (cf. exemple 2). La protéine IRS-1 a été extraite grâce à un anticorps monoclonal anti-IRS-1. Cette extraction est réalisée après une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps monoclonal

ambiante dans une solution de 5% de lait dans un tampon PBS. La membrane est ensuite lavée trois fois avec un tampon PBS, incubée dans un tampon PBS contenant 1  $\mu\text{g/ml}$  d'anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine pendant 2 heures à température ambiante, et lavée trois fois avec un tampon PBS. Les protéines sont ensuite révélées au moyen d'un anticorps secondaire anti-isotype couplé à la peroxydase. On constate que la protéine IRS-1 de poids moléculaire 180 kDa est phosphorylée au niveau du résidu tyrosine dans les préparations issues des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF ; cette protéine est très faiblement phosphorylée au niveau du résidu tyrosine dans la préparation issue des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF (Figure 2)

Exemple 4 : Evaluation de l'activité anti-angiogénique *in vitro* de l'oligonucléotide.

Des cellules endothéliales humaines sont mises en culture sur un tapis du collagène type I. Au septième jour de culture, les puits de culture sont divisés en quatre lots :

Lot 1 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales non traitées. (Figure 3A)

Lot 2 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales stimulées avec 3 ng/ml de bFGF. (Figure 3B)

Lot 3 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales incubés avec 100  $\mu\text{g/ml}$  d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures, puis stimulées avec 3 ng/ml de bFGF. (Figure 3C)

Lot 4 : Puits correspondant au culture des cellules endothéliales incubés avec 100  $\mu\text{g/ml}$

anti-IRS-1 (Sigma). Après addition de l'anticorps anti-IRS-1 couplé à l'agarose, la suspension est incubée pendant 2 heures à température ambiante, puis centrifugée à 4000 g pendant 15 min. Le précipité obtenu est repris avec une solution d'électrophorèse contenant 2% SDS et 15 mM de dithiothréitol, chauffé à 100 °C pendant 5 min. puis déposé en gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 15% en acrylamide) dans des conditions dénaturantes (en présence de 2% SDS). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée par une incubation à température ambiante dans une solution de 5% de lait dans un tampon PBS. La membrane est ensuite lavée trois fois avec un tampon PBS, incubée dans un tampon PBS contenant 1 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine pendant 2 heures à température ambiante, et lavée trois fois avec un tampon PBS. Les protéines sont ensuite révélées au moyen d'un anticorps secondaire anti-isotype couplé à la peroxydase. On constate que la protéine IRS-1 de poids moléculaire 180 kDa est phosphorylée au niveau du résidu tyrosine dans les préparations issues des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF ; cette protéine est très faiblement phosphorylée au niveau du résidu tyrosine dans la préparation issue des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF (Figure 2)

Exemple 4 : Evaluation de l'activité anti-angiogénique in vitro de l'oligonucléotide.

Des cellules endothéliales humaines sont mises en culture sur un tapis du collagène type I. Au septième jour de culture, les puits de culture sont divisés en quatre lots :

d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures. (Figure 3D)

5                   Après 3 à 4 jours de culture, les différents  
puits sont examinés à l'aide de microscope optique à  
phase inverse. A la lecture des résultats, il apparaît  
que les cellules endothéliale humaines dans le lot 2  
forment des tubes capillaires suite à la stimulation avec  
le bFGF. On constate aussi que l'oligonucléotide inhibe  
10 la formation de néovaisseaux par ces mêmes cellules  
stimulées avec le bFGF dans le lot 3. On observe enfin  
que l'oligonucléotide ne modifie pas de manière prononcée  
la croissance des cellules endothéliales. En effet, le  
nombre des cellules endothéliales dans le puits de lot 1  
15 et ceux de lot 4 sont comparables.

Exemple 5 : Evaluation de l'activité in vivo  
de l'oligonucléotide.

20                   Trois lots de souris nude ont été utilisés.  
Chaque lot étant constitué de 5 souris.

                  Lot N°1 : Ce lot a servi de témoin. Chaque  
souris est inoculée en sous-cutané à J0 avec 200  $\mu$ l d'une  
suspension de cellules de mélanome B16 (fournies par  
l'Institut Gustave Roussy de Villejuif) dispersées dans  
25 du PBS à raison de  $10^6$  cellules/ml. Ces souris ne sont  
pas traitées par la suite.

                  Lot N°2 : Chaque souris est inoculée en sous-  
cutané à J0 avec 200  $\mu$ l d'une suspension de cellules de  
mélanome B16 dispersées dans du PBS à raison de  $10^6$   
30 cellules/ml. A J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9 et J10  
chaque souris reçoit une injection en sous-cutanée de 200  
 $\mu$ l d'une solution d'oligonucléotide diluée dans du PBS à  
une concentration de 500  $\mu$ g/ml. L'injection



Lot 1 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales non traitées. (Figure 3A)

Lot 2 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales stimulées avec 3 ng/ml de bFGF. (Figure 3B)

Lot 3 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales incubés avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures, puis stimulées avec 3 ng/ml de bFGF. (Figure 3C)

Lot 4 : Puits correspondant au culture des cellules endothéliales incubés avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures. (Figure 3D)

Après 3 à 4 jours de culture, les différents puits sont examinés à l'aide de microscope optique à phase inverse. A la lecture des résultats, il apparaît que les cellules endothéliale humaines dans le lot 2 forment des tubes capillaires suite à la stimulation avec le bFGF. On constate aussi que l'oligonucléotide inhibe la formation de néovaisseaux par ces mêmes cellules stimulées avec le bFGF dans le lot 3. On observe enfin que l'oligonucléotide ne modifie pas de manière prononcée la croissance des cellules endothéliales. En effet, le nombre des cellules endothéliales dans le puits de lot 1 et ceux de lot 4 sont comparables.

Exemple 5 : Evaluation de l'activité in vivo de l'oligonucléotide.

Trois lots de souris nude ont été utilisés. Chaque lot étant constitué de 5 souris.

Lot N°1 : Ce lot a servi de témoin. Chaque souris est inoculée en sous-cutané à J0 avec 200 µl d'une

d'oligonucléotide est effectuée à proximité du site d'injection des cellules.

Lot N°3 : Les souris de ce lot ne sont pas inoculées avec les cellules de mélanome B16. Cependant, chacune de ces souris reçoit une injection de 200  $\mu$ l d'une solution d'oligonucléotide dans du PBS à une concentration de 500  $\mu$ g/ml ; les injections sont faites à J1, J2 J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9 et J10.

Les résultats sont les suivants :

Après inoculation, chez les souris du lot N°1, la masse tumorale se développe d'une façon très rapide. En effet, la masse tumorale atteint une taille de 1,6 à 2,5 cm de diamètre après dix jours chez les souris dudit lot N°1 (souris non traitées). L'évolution de la masse tumorale chez les souris du lot N°2 (souris traitées après inoculation par injection d'oligonucléotide à J1, J2 et J3), montre une augmentation nettement moindre du volume de la masse tumorale. La masse tumorale chez les souris du lot 2 ne dépasse pas 0,8 cm de diamètre au dixième jour. Au quatorzième jour, la différence entre la masse tumorale des souris de lots N°2 et celle des souris du lot N°1 est remarquable.

Chez les souris du lot N°3 (souris n'ayant pas reçu de cellules de mélanome B16, mais traitées par injection d'oligonucléotide pendant trois jours) on note un effet général inattendu sur la peau. Il est identique à celui noté chez toutes les souris qui ont été traitées par l'oligonucléotide (lot 2). La peau prend un aspect vieilli, fripé. On note aussi l'apparition de poils chez toutes les souris traitées. Il existe un parallélisme au cours de l'évolution entre la régression des signes cutanés et la reprise de la croissance tumorale.

suspension de cellules de mélanome B16 (fournies par l'Institut Gustave Roussy de Villejuif) dispersées dans du PBS à raison de  $10^6$  cellules/ml. Ces souris ne sont pas traitées par la suite.

5                    Lot N°2 : Chaque souris est inoculée en sous-cutané à J0 avec 200  $\mu$ l d'une suspension de cellules de mélanome B16 dispersées dans du PBS à raison de  $10^6$  cellules/ml. A J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9 et J10  
10                    chaque souris reçoit une injection en sous-cutanée de 200  $\mu$ l d'une solution d'oligonucléotide diluée dans du PBS à une concentration de 500  $\mu$ g/ml. L'injection d'oligonucléotide est effectuée à proximité du site d'injection des cellules.

15                    Lot N°3 : Les souris de ce lot ne sont pas inoculées avec les cellules de mélanome B16. Cependant, chacune de ces souris reçoit une injection de 200  $\mu$ l d'une solution d'oligonucléotide dans du PBS à une concentration de 500  $\mu$ g/ml ; les injections sont faites à J1, J2 J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9 et J10.

20                    Les résultats sont les suivants :

                  Après inoculation, chez les souris du lot N°1, la masse tumorale se développe d'une façon très rapide. En effet, la masse tumorale atteint une taille de 1,6 à 2,5 cm de diamètre après dix jours chez les souris dudit lot N°1 (souris non traitées). L'évolution de la  
25                    masse tumorale chez les souris du lot N°2 (souris traitées après inoculation par injection d'oligonucléotide à J1, J2 et J3), montre une augmentation nettement moindre du volume de la masse  
30                    tumorale. La masse tumorale chez les souris du lot 2 ne dépasse pas 0,8 cm de diamètre au dixième jour. Au quatorzième jour, la différence entre la masse tumorale

On constate donc que l'oligonucléotide inhibe la développement et la formation des néovaisseaux par les cellules endothéliales *in vitro*; Il possède d'autre part une activité anti-tumorale *in vivo* remarquable chez la souris nude.

des souris de lots N°2 et celle des souris du lot N°1 est remarquable.

5 Chez les souris du lot N°3 (souris n'ayant pas reçu de cellules de mélanome B16, mais traitées par injection d'oligonucléotide pendant trois jours) on note un effet général inattendu sur la peau. Il est identique à celui noté chez toutes les souris qui ont été traitées par l'oligonucléotide (lot 2). La peau prend un aspect vieilli, fripé. On note aussi l'apparition de poils chez 10 toutes les souris traitées. Il existe un parallélisme au cours de l'évolution entre la régression des signes cutanés et la reprise de la croissance tumorale.

On constate donc que l'oligonucléotide inhibe la développement et la formation des néovaisseaux par les 15 cellules endothéliales *in vitro*; Il possède d'autre part une activité anti-tumorale *in vivo* remarquable chez la souris nude.

## REVENDEICATIONS

1) Un oligonucléotide constitué par la séquence nucléotidique de formule SEQ ID NO.2 :

5 5'-TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3'  
un fragment de celle-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

10 2) Un oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence nucléotidique de formule SEQ ID NO. 3 :

5'-TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCT-3'  
un fragment de celle-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

15 3) Un oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence nucléotidique de formule SEQ ID NO. 4 :

5'-TCGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3'  
20 fragment de celle-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

25 4) Un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que tout ou partie des liaisons phosphodiester est protégée.

5) Un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les extrémités 5' et/ou 3' sont protégées.

30 6) Une composition pharmaceutique comprenant comme agent actif au moins un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, avantageusement

## REVENDICATIONS

5 1) Composition pharmaceutique pour l'inhibition du gène codant la protéine IRS-1 destinée au traitement d'une pathologie liée aux phénomènes d'angiogenèse, comprenant comme agent actif un oligonucléotide complémentaire d'une partie dudit gène ou d'un transcrit dudit gène.

10

2) Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est constitué par la séquence nucléotidique de formule SEQ ID NO.2 :

15

5'-TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3'

un fragment de celle-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

20

3) Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est constitué par la séquence nucléotidique de formule SEQ ID NO. 3 :

5'-TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCT-3'

25

un fragment de celle-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

30

4) Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est constitué par la séquence nucléotidique de formule SEQ ID NO. 4 :

5'-TCGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3'

fragment de celle-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

associé dans ladite composition avec un véhicule acceptable.

5                    7) Une composition pharmaceutique pour l'inhibition du gène codant la protéine IRS-1 comprenant comme agent actif un oligonucléotide complémentaire d'une partie dudit gène ou d'un transcrit dudit gène.

10                   8) Une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7 pour être utilisée contre la multiplication cellulaire.

15                   9) Une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 pour être utilisée dans le traitement des tumeurs.

20                   10) Une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 pour être utilisée dans le traitement d'une rétinopathie.

                    11) Une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 pour être utilisée dans la prévention de mélanomes.

25                   12) Une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme pour être administrée par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou transdermique, et en ce qu'elle comprend  
30                   de 0,001 mg à 50 mg d'agent actif.



5) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ce que tout ou partie des liaisons phosphodiester de l'oligonucléotide est protégée.

5

6) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ce que les extrémités 5' et/ou 3' de l'oligonucléotide sont protégées.

10

7) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ce que l'oligonucléotide est associé dans ladite composition avec un véhicule acceptable.

15

8) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour être utilisée dans le traitement d'une rétinopathie.

20

9) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme pour être administrée par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou transdermique, et en ce qu'elle comprend de 0,001 mg à 50 mg d'agent actif.

25

N : cellules non stimulées avec le bFGF  
S : cellules stimulées avec le bFGF

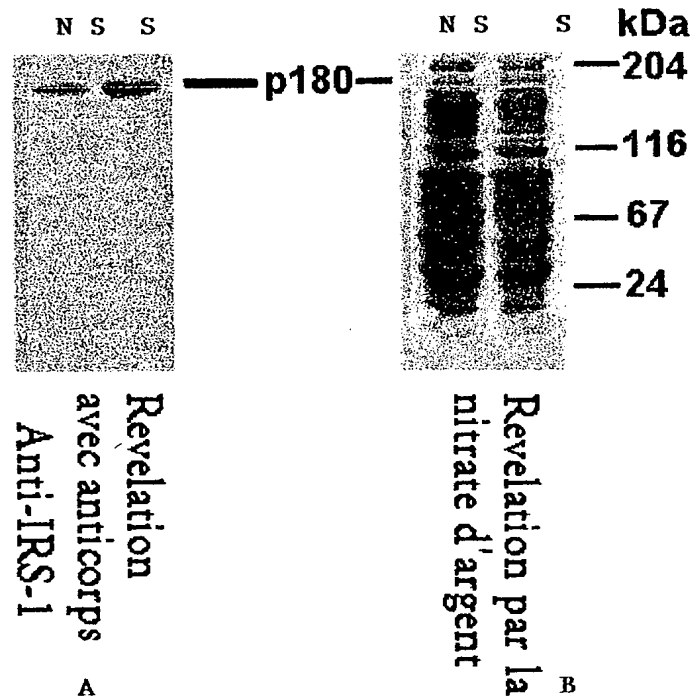
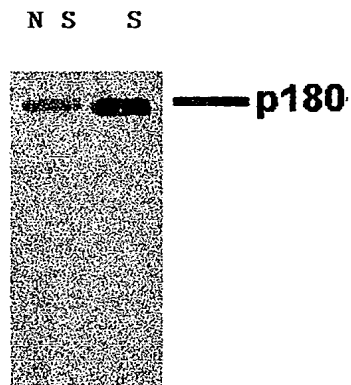


Fig.1

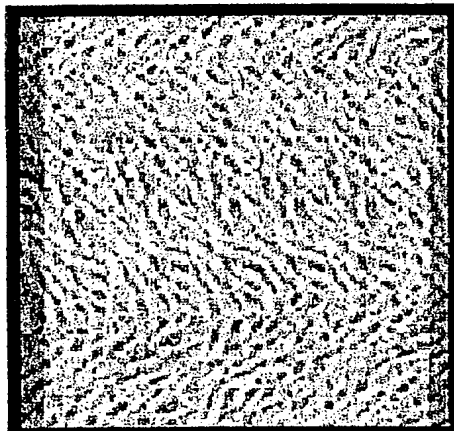
**N S :** cellules non stimulées avec le bFGF  
**S :** cellules stimulées avec le bFGF



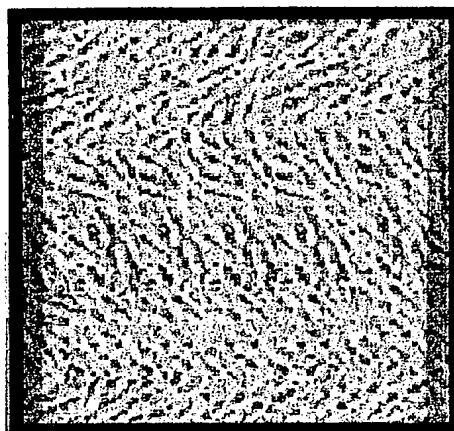
**Revelation avec anticorps anti-phosphotyrosine**

**Fig.2**

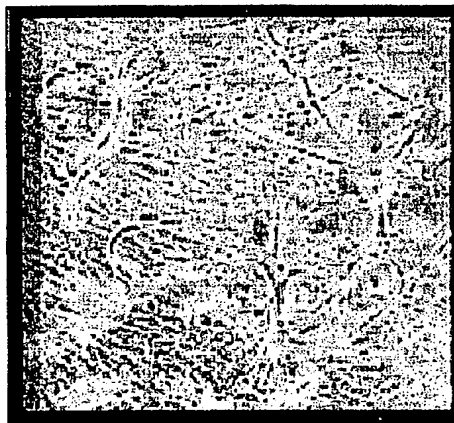
LOT 4



LOT 3



LOT 2



LOT 1

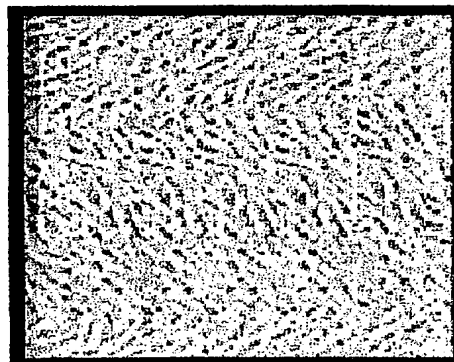


Fig. 3

## SEQUENCE LISTING

<110> AL MAHMOOD, SALMAN  
<120> Oligonucleotides antisens capables d'inhiber la formation de tubes capillaires par les cellules endothéliales.  
<130> B6531-juin2001  
<140> FR2001-xxxxx  
<141> 2001-06-14  
<160> 27  
<170> PatentIn version 3.0  
<210> 1  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(48)  
<223> oligonucleotide sens  
<400> 1  
tcgatgtgac gctactgatg agtccgtgag gacgaaactc tggcctag 48

<210> 2  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(35)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 2  
tatccggagg gctcgccatg ctgctgcgga gcaga 35

<210> 3  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(25)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 3  
tatccggagg gctcgccatg ctgct 25

<210> 4  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(23)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 4  
tcgccatgct gctgcggagc aga 23

<210> 5  
<211> 25

<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(25)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 5  
tatccggagg gcctgccatg ctgct 25

<210> 6  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 6  
tatccggagg gcctgccatg ctgc 24

<210> 7  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(23)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 7  
tatccggagg gcctgccatg ctg 23

<210> 8  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 8  
tatccggagg gcctgccatg ct 22

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(21)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 9  
tatccggagg gcctgccatg c 21

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 10  
tatccggagg gcctgccatg 20

<210> 11  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(19)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 11  
tatccggagg gcctgccat 19

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(18)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 12  
tatccggagg gcctgcca 18

<210> 13  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(17)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 13  
tatccggagg gcctgcc 17

<210> 14  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(16)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 14  
tatccggagg gcctgc 16

<210> 15  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(15)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 15  
tatccggagg gcctg 15

<210> 16  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 16  
tatccggagg gcct 14

<210> 17  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 17  
tatccggagg gcc 13

<210> 18  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> Ologonucleotide anti-sens.  
<400> 18  
tatccggagg gc 12

<210> 19  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 19



ccggaggggcc tgccatgctg ct 22

<210> 20  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(19)  
<223> Oigonucleotide anti-sens.  
<400> 20  
gagggcctgc catgctgct 19

<210> 21  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(16)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 21  
ggcctgccat gctgct 16

<210> 22  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 22  
ctgccatgct gct 13

<210> 23  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> Oligonucleotide anti-sens.  
<400> 23  
tgccatgctg ct 12

<210> 24  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)

<223> Oligonucleotide anti-sens;  
 <400> 24  
 tttttttttt ttgg

14

<210> 25  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Séquence artificielle.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> Oligonucleotide anti-sens.  
 <400> 25  
 tttttttttt ttag

14

<210> 26  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Séquence artificielle  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> Oligonucleotide anti-sens.  
 <400> 26  
 tttttttttt ttcg

14

<210> 27  
 <211> 326  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(326)  
 <223> Fragment du gène IRS-1 codant pour le substrat du récepteur de l'insuline  
 <400> 27  
 gtgccgagct gagttcctta taagaattaa tcttaatttt gtattttttc ctgtaagaca 60  
 ataggccatg ttaattaaac tgaagaagga tatatttggc tgggtgtttt caaatgtcag 120  
 cttaaaattg gtaattgaat ggaagcaaaa ttataagaag aggaaattaa agtcttccat 180  
 tgcattgtatt gtaaacagaa ggagatgggt gattccttca attcaaaagc tctctttgga 240  
 atgaacaatg tgggcgtttg taaattcttg aaatgtcttt ctattcataa taaactagat 300  
 actgttgatc ttttaaaaaa aaaaaa 326